

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 21 JUL 2004

WIPO

PCT

01.07.2004

EP04/6180

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 26 302.0

Anmeldetag:

11. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

GNOTHIS Holding SA, Ecublens/CH

Bezeichnung:

Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum
Nachweis von Nukleinsäuren

IPC:

C 12 Q 1/68

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Juni 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Dzierzon

BEST AVAILABLE COPY

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte

European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

Unser Zeichen:
30024P DE/WWpu

Anmelder:
Gnothis Holding SA

1015 Ecublens
SCHWEIZ

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKÄ
DIPL.-PHYS. DR. J. FRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren

Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft 5'-3'-Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum Nachweis von Analyten, insbesondere von Nukleinsäuren, insbesondere für die konfokale Fluoreszenzspektroskopie.

10

Der Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer Probe erfolgt üblicherweise durch Hybridisierung unter Verwendung von spezifischen Sonden. Eine Möglichkeit zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der Hybridisierungsprodukte besteht darin, die Sonden mit Fluoreszenz-Farbstoffgruppen zu markieren, wobei die Markierungsgruppen in der Regel an das 5'-Ende der Nachweissonde gebunden werden. Nach Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge emittieren die Fluoreszenz-Markierungsgruppen Photonen, die mittels geeigneter Detektionsmethoden nachgewiesen werden können. Das Auftreten einer Fluoreszenz-Markierung korreliert mit dem Vorhandensein der nachzuweisenden Nukleinsäure in der Probe. Durch Verwendung geeigneter Methoden können auch Anzahl und Größe der Hybridisierungsprodukte bestimmt werden.

15

20

25

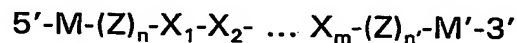
30

Die Anzahl der von den markierten Sonden emittierten Photonen hat einen erheblichen Einfluss auf die Sensitivität des Nachweisverfahrens. Während mit roten Fluoreszenz-Markierungsgruppen markierte Sonden in vielen Fällen eine ausreichende Sensitivität [ausgedrückt in IPM (Impulse pro Molekül)] aufweisen, ist die Quantenausbeute bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe im grünen Bereich aufgrund von Elektronentransfervorgängen zwischen Nukleobasen und der Markierungsgruppe verringert. Um diese Wechselwirkungen zu vermindern, wurden Spacermoleküle, z.B. Hexaethylenglycol-Moleküle, zwischen der Sondensequenz und den Markierungsgruppen angebracht, die zu einer

geringfügigen, aber für viele Anwendungen nicht ausreichenden Verbesserung führen.

5 Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand darin, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und insbesondere Sonden zum Nachweis von Analyten, z.B. von Nukleinsäuren mit verbesserter Sensitivität bereitzustellen.

10 Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Sonde der allgemeinen Strukturformel (I)



15 worin X_1 , X_2 ... und X_m jeweils für ein beliebiges Nukleotid oder Nukleotidanalogen stehen und worin die Sequenz $X_1-X_2- \dots X_m$ für eine mit einem Analyten bindefähige Sondensequenz steht,

Z jeweils unabhängig für ein Pyrimidin-Nukleotid oder -Nukleotidanalogen steht,

M und M' Fluoreszenzmarkierungsgruppen darstellen,

20 n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 1 bis 15 darstellen und m eine ganze Zahl entsprechend der Länge der Sondensequenz darstellt.

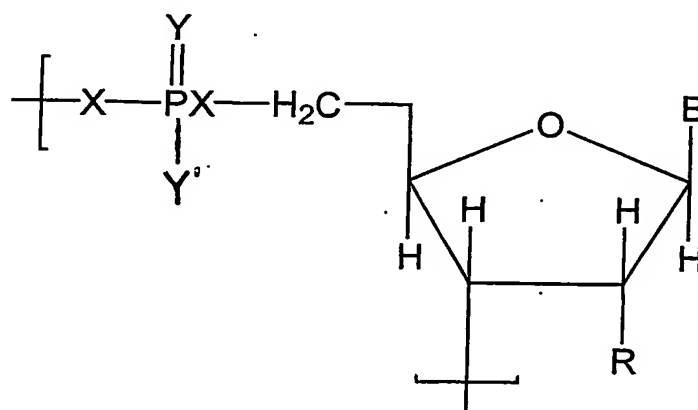
Die erfindungsgemäßen Nachweissonden enthalten neben der Fluoreszenz-Markierungsgruppe am 5'-Ende eine zweite Markierungsgruppe am 3'-Ende.

25 Diese beiden Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle sind von der mit der Zielnukleinsäure hybridisierenden Sondensequenz durch Oligo-Pyrimidin-Sequenzen als Spacer getrennt. Die IPM-Werte der erfindungsgemäßen Sonden sind bis zu 10 mal höher als diejenigen der aus dem Stand der Technik bekannten Sonden.

30

Die erfindungsgemäßen Sonden können aus Nukleotid- und Nukleotidanalogen-Bausteinen wie aus dem Stand der Technik bekannt,

z.B. PNA- oder LNA-Bausteinen, aufgebaut sein. Vorzugsweise sind die mit dem Analyten bindefähige Sondensequenz bildenden Einheiten X_1 , X_2 ... und X_m jeweils unabhängig ausgewählt aus Einheiten der allgemeinen Strukturformel (II) oder Salzen davon



worin

B eine natürliche oder nicht-natürliche Nukleobase darstellt,

R einen Rest, ausgewählt aus H, OH, Halogen, $-\text{CN}$, $-\text{C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl}$, $-\text{C}_2\text{-C}_6\text{-Alkenyl}$, $-\text{C}_2\text{-C}_6\text{-Alkynyl}$, $-\text{O-C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl}$, $-\text{O-C}_2\text{-C}_6\text{-Alkenyl}$, $-\text{O-C}_2\text{-C}_6\text{-Alkynyl}$, $-\text{SH}$, $-\text{S-C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl})$ und $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl})_2$, darstellt,

$-\text{X}$ jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}'$ - und CR'_2 darstellt,

$-\text{Y}$ jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus $=\text{O}$ und $=\text{S}$, darstellt und

$-\text{Y}'$ jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus $-\text{OR}'$, $-\text{SR}'$, $-(\text{NR}')_2$ und $-\text{CH}(\text{R}')_2$ darstellt,

wobei R' jeweils unabhängig für H oder $\text{C}_1\text{-C}_3\text{-Alkyl}$ steht.

Die Nukleobase B kann eine natürliche Nukleobase, z.B. Adenin, Cytosin, Uracil, Guanin oder Thymin, oder eine nicht-natürliche Nukleobase, z.B. 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, ein 5-modifiziertes Thymin- oder Cytosin-Derivat oder Isoguanin (6-Amino-2-hydroxy-purin), sein.

Der Substituent R an der 2'-Position ist vorzugsweise H, so dass die Einheiten X_1 , X_2 ... und X_m zumindest teilweise 2'-Desoxynukleotide sind. Andere bevorzugte Bedeutungen für R sind Alkyl, Alkoxy, Alkenyl und Halogen.

Die Einheiten der erfindungsgemäßen Sonde sind durch Phosphodiestergruppen oder modifizierte Phosphodiestergruppen verknüpft, worin bei den Einheiten der Strukturformel (II) X vorzugsweise jeweils unabhängig -O-, -S- oder -NH- darstellt, Y vorzugsweise jeweils unabhängig =O oder =S darstellt und Y' vorzugsweise jeweils unabhängig -OH, -SH, -NH₂, -CH₃ oder -C₂H₅ darstellt.

In der Strukturformel (I) steht Z für ein Pyrimidin-Nukleotid oder ein Pyrimidin-Nukleotidanalogen, z.B. ein Thymidin- oder/und Cytidin-Nukleotid bzw. Nukleotidanalogen. Vorzugsweise steht Z für ein Thymidin-Nukleotid, so dass $(Z)_n$ und $(Z)_{n'}$ vorzugsweise jeweils mindestens ein Thymidin-Nukleotid enthalten. Besonders bevorzugt bedeutet Z jeweils ein Thymidin-2'-Desoxynukleotid. Grundsätzlich kann Z jedoch auch eine Nukleotidanalogen-Einheit, wie zuvor beschrieben, darstellen.

Die Fluoreszenz-Markierungsgruppen der Sonde (I) sind vorzugsweise jeweils unabhängig ausgewählt aus Rhodaminen, Fluoresceinen, Oxazinen, Cyaninen, Bodipy Farbstoffen, Alexa-Farbstoffen etc. Besonders bevorzugt sind Oxazine gemäß PCT/EP03/02981. Besonders bevorzugt sind M und M' grüne Fluoreszenz-Markierungsgruppen, wie etwa Rhodamingrün, Tetramethylrhodamin, Rhodamin 6G, Oregon grün, Bodipy 493, Alexa 488,

deren Quantenausbeute bei üblichen Sondenkonstrukten durch Elektronentransfer-Prozesse gequenchet wird.

Die Fluoreszenz-Markierungsgruppen M und M' sind vorzugsweise gleich.
5 In bestimmten Ausführungsformen können M und M' jedoch auch verschieden sein. In diesem Fall unterscheiden sich M und M' vorzugsweise in mindestens einem Messparameter, z.B. Emissionswellenlänge oder/und Abklingzeit, so dass ein separater Nachweis von M und M' möglich ist.

10 Bei den Sonden (I) ist die Länge der Spacer n und n' jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 1-15, vorzugsweise eine ganze Zahl von 3-10, besonders bevorzugt etwa 5.

Die Länge m der mit den Analyten bindenden Sondensequenz wird
15 günstigerweise so gewählt, dass unter den herrschenden Testbedingungen eine spezifische und nachweisbare Bindung des Analyten möglich ist. Üblicherweise stellt m eine ganze Zahl von 10-90, vorzugsweise von 12-50 dar.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer oder mehrerer Sonden der Strukturformel (I) in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, z.B. einer Nukleinsäure, in einer Probe, wobei das Verfahren den Nachweis einer Bindung von einer oder mehreren Sonden an den Analyten umfasst. Vorzugsweise umfasst das Verfahren den Nachweis
25 einer Hybridisierung von einer oder mehreren Sonden mit einer Zielnukleinsäure. Gegebenenfalls kann das Verfahren einen quantitativen Nachweis hinsichtlich der Anzahl der Hybridisierungsprodukte in der Probe oder/und der Größe der Hybridisierungsprodukte umfassen. Es sind jedoch auch andere Nachweisverfahren möglich, z.B. Nachweis der Bindung von
30 einer oder mehreren Sonden an ein Protein, wie etwa der Bindung von Aptameren an Proteine.

Die hervorragende Sensitivität der erfindungsgemäßen Nachweissonden erlaubt deren Einsatz auch bei sehr geringen Analytkonzentrationen. So wird bei Verwendung der erfindungsgemäßen Sonden eine ausreichende Nachweissensitivität selbst dann erzielt, wenn die Konzentration des nachzuweisenden Analyten $\leq 10^{-9}$ M in der Probe beträgt. Vorzugsweise beträgt die Konzentration des nachzuweisenden Analyten 10^{-10} bis 10^{-15} M. Die hohe Sensitivität der erfindungsgemäßen Sonden erlaubt einen Nachweis bei derart geringen Konzentrationen auch ohne vorhergehende Amplifikation des Analyten in der Probe.

Der nachzuweisende Analyt ist vorzugsweise eine Nukleinsäure, z.B. DNA oder RNA beliebiger Herkunft, die beispielsweise aus Prokaryonten, insbesondere pathogenen Prokaryonten, Archea oder Eukaryonten, insbesondere Säugern, wie etwa dem Menschen, stammen kann. Besonders bevorzugt stammt die nachzuweisende Nukleinsäure aus einer humanen Probe, z.B. einer Körperflüssigkeit, einer Gewebeprobe etc.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der nachzuweisenden Nukleinsäure um eine RNA aus einer biologischen Probe oder eine daraus synthetisierte nicht-amplifizierte cDNA. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der nachzuweisenden Nukleinsäure um eine nicht-amplifizierte genomische DNA.

Der Nachweis der Fluoreszenz der erfindungsgemäßen Sonden kann mit einer beliebigen Messmethode, z.B. mit einer orts- oder/und zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgen. Bevorzugt wird eine Messmethode verwendet, die in der Lage ist, in einem sehr kleinen Volumenelement, Fluoreszenzsignale bis hinunter zu Einzelphotonenzählung zu erfassen.

Beispielsweise kann die Detektion mittels konfokaler Einzelmoleküldetektion, wie etwa durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfolgen, wobei ein sehr kleines, vorzugsweise

ein konfokales Volumenelement, beispielsweise $0,1 \times 10^{-15}$ bis 20×10^{12} l der Probenflüssigkeit, dem Anregungslicht eines Lasers ausgesetzt wird, das die in diesem Messvolumen befindlichen Fluoreszenzmarkierungen zur Emission von Fluoreszenzstrahlung anregt, wobei die emittierte
5 Fluoreszenzstrahlung aus dem Messvolumen mittels eines Photodetektors gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der relativen Beweglichkeit der beteiligten Moleküle erstellt werden kann, so dass bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Messvolumen identifiziert werden
10 können.

Auf Einzelheiten zur Verfahrensdurchführung und apparative Details zu den für die Detektion verwendeten Vorrichtungen wird auf die Offenbarung des europäischen Patentes 0 679 251 verwiesen. Die konfokale
15 Einzelmolekülbestimmung ist weiterhin bei Rigler und Mets (Soc. Photo-Opt.Instrum.Eng. 1921 (1993), 239 ff.) und Mets und Rigler (J. Fluoresc. 4 (1994), 259-264) beschrieben.

Alternativ bzw. zusätzlich kann die Detektion auch durch eine
20 zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time Gating erfolgen, wie beispielsweise von Rigler et al., "Picosecond Single Photon Fluorescence Spectroscopy of Nucleic Acids", in: "Ultrafast Phenomena", D.H. Auston, Ed., Springer 1984, beschrieben. Dabei erfolgt die Anregung der Fluoreszenzmoleküle innerhalb eines Messvolumens und anschließend -
25 vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von ≥ 100 ps - das Öffnen eines Detektionsintervalls am Fotodetektor. Auf diese Weise können durch Raman-Effekte erzeugte Hintergrundsignale ausreichend gering gehalten werden, um eine im Wesentlichen störungsfreie Detektion zu ermöglichen.

30 Besonders bevorzugte Detektionsverfahren und -vorrichtungen sind z.B. in PCT/EP01/07190, PCT/EP01/05408, PCT/EP01/05410, PCT/EP01/05409,

PCT/EP01/13120, PCT/EP02/02582, PCT/EP02/05866, PCT/EP02/13390, PCT/EP02/09610 und PCT/EP03/02713 beschrieben.

5 Besonders bevorzugt erfolgt die Verfahrensdurchführung derart, dass man mehrere Fluoreszenz-markierte Sonden, wobei es sich mindestens bei einer Sonde um eine erfindungsgemäße Sonde handelt, mit jeweils verschiedener Sequenz und verschiedenen Markierungsgruppen zum Nachweis eines einzigen Analyten verwendet. In diesem Fall wird das Vorhandensein des Analyten in der Probe vorzugsweise durch Vorhandensein einer Korrelation
10 zwischen dem Auftreten verschiedener Sonden entsprechend der gleichzeitigen Bindung an den Analyten bestimmt. Vorzugsweise wird ein solches Verfahren als Kreuzkorrelationsbestimmung durchgeführt, wie z.B. bei Schwille et al. (Biophys. J. 72 (1997), 1878-1886) und Rigler et al. (J. Biotechnol. 63 (1998), 97-109) beschrieben. Andere bevorzugte
15 Nachweismethoden umfassen die Koinzidenz-Analyse, die Principle Component-Analyse (PCA), die Fluoreszenzintensitäts-Distributionsanalyse (FIDA) und die Fluoreszenzintensitäts-Multiple-Distributionsanalyse (FIMDA).

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine Sondenkombination verwendet, die eine erfindungsgemäße doppelt markierte Sonde, die grüne Fluoreszenz-Markierungsgruppen trägt, zusammen mit einer Sonde, die eine oder mehrere rote Fluoreszenz-Markierungsgruppen trägt, beinhaltet.

25 Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einer oder mehreren erfindungsgemäßen Sonden unter Bedingungen, bei denen eine Bindung der einen oder mehreren Sonden an den
30 nachzuweisenden Analyten erfolgen kann, und Bestimmen, ob eine Bindung stattfindet oder nicht.

Vorzugsweise ist der Analyt eine Nukleinsäure und der Nachweis umfasst eine Hybridisierung der einen oder mehreren Sonden mit der nachzuweisenden Nukleinsäure. Besonders bevorzugt wird die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Inkontaktbringen mit der oder den Sonden nicht einer Amplifikation, z.B. einer PCR, unterzogen.

Weiterhin soll die Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.

Beispiel: Verwendung von Bi-fluorophor-markierten Oligonukleotiden

Im Folgenden wird die hervorragende Sensitivität der Nachweissonden verdeutlicht. Es werden zwei unterschiedliche grüne Sonden mit identischer Sequenz verwendet. Im ersten Fall handelt es sich um eine 5'-Rhodamingrün einfach markierte Sonde, im anderen Fall um eine erfindungsgemäße 5'-3' Rhodamingrün doppelt markierte Sonde, die einen Thymidin-Spacer von jeweils 5 Nukleotiden Länge sowohl für den 3' als auch 5'-Farbstoff beinhaltet. Die Sequenz der Nachweissonde ist spezifisch für die PGK-1-Sequenz (Accession-Number: V00572). Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze werden jeweils eine grüne markierte Sonde und eine rote markierte Sonde (ebenfalls PGK-1 spezifisch) in Lösung gleichzeitig an ein PGK-1-spezifisches cDNA-Fragment (Länge: 969 nt) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt in 6 X SSC, 0,06 % NP40 Puffer bei 60 °C über einen Zeitraum von 8 Stunden. Dabei werden unterschiedliche Konzentrationen des PGK-1 Fragments (0,0 nM PGK-1 bis 2 nM PGK-1) verwendet. Die Hybridisierungsprodukte werden mittels Kreuzkorrelationsspektroskopie analysiert.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in den Figuren 1 und 2 gezeigt. In Figur 1 (Vergleichsbeispiel) wird die Kombination einer 5'-einfach markierten grünen Sonde und einer 5'-einfach markierten roten Sonde zum Nachweis

von PGK-1 cDNA in Konzentrationen von 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,2 nM und 0 nM untersucht.

5 In Figur 2 (Erfindungsbeispiel) wird die Kombination einer erfindungsgemäßen 5'3'-doppelt markierten grünen Sonde mit Thymidinspacer und einer 5'-einfach markierten roten Sonde zum Nachweis von PGK-1 cDNA in Konzentrationen von 0,05 nM, 0,03 nM, 0,02 nM, 0,01 nM, 0,005 nM und 0 nM untersucht.

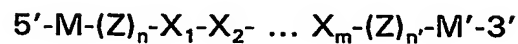
10 Die Sondenkonzentration in Figur 1 ist 2,0 nM und in Figur 2 0,1 nM.

Ein Vergleich der Figuren 1 und 2 zeigt eindrucksvoll die Vorteile der erfindungsgemäßen Nachweissonden. Während die untere Nachweisgrenze der einfach markierten Sonde bei 0,2 nM PGK-1 liegt (Figur 1), kann bei
15 Verwendung der doppelt markierten sonde die Sensitivität deutlich auf 5 nM PGK-1 erhöht werden (Figur 2).

Ansprüche

1. Sonde der allgemeinen Strukturformel (I)

5



10

worin X_1 , $X_2 \dots$ und X_m jeweils für ein beliebiges Nukleotid oder Nukleotidanalogen stehen und worin die Sequenz $X_1-X_2- \dots X_m$ für eine mit einem Analyten bindefähige Sondensequenz steht,

Z jeweils unabhängig für ein Pyrimidin-Nukleotid oder -Nukleotidanalogen steht,

M und M' Fluoreszenzmarkierungsgruppen darstellen,

15

n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 1 bis 15 darstellen und

m eine ganze Zahl entsprechend der Länge der Sondensequenz darstellt.

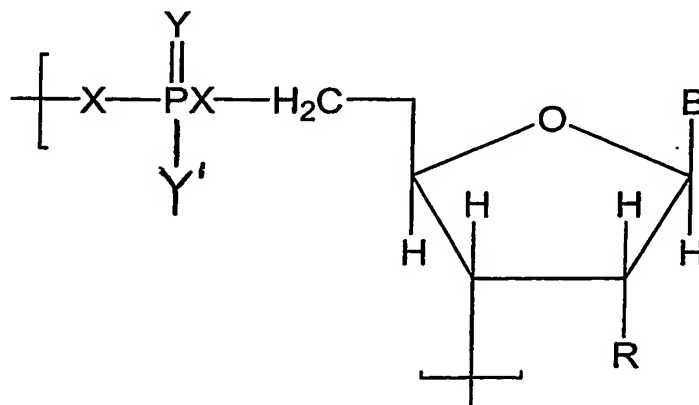
2. Sonde nach Anspruch 1,

20

dadurch gekennzeichnet,

dass X_1 , $X_2 \dots$ und X_m jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Einheiten der allgemeinen Strukturformel (II) oder Salzen davon:

25



30

worin

B eine natürliche oder nicht-natürliche Nukleobase darstellt,

R einen Rest, ausgewählt aus H, OH, Halogen, -CN, -C₁-C₆-Alkyl,
-C₂-C₆-Alkenyl, -C₂-C₆-Alkynyl, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-
5 C₂-C₆-Alkynyl, -SH, -S-C₁-C₆-Alkyl, -NH₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl) und -N(C₁-
C₆-Alkyl)₂, darstellt,

-X jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -O-, -S-, -NR'-
und -CR'₂- darstellt,

-Y jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus =O und =S,
10 darstellt und

-Y' jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -OR', -SR',
-(NR')₂ und -CH(R')₂ darstellt,

wobei R' jeweils unabhängig für H oder C₁-C₃-Alkyl steht.

15 3. Sonde nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass X₁, X₂ ... und X_m 2'-Desoxynukleotide sind.

20 4. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass Z aus Thymidin- oder/und Cytidin-Nukleotiden oder -
Nukleotidanaloga ausgewählt ist.

25 5. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass mindestens ein Z für ein Thymidin-Nukleotid oder -
Nukleotidanalogen steht.

30 6. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass Z jeweils ein Thymidin-2'-Desoxynukleotid ist.

- 5 7. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' jeweils unabhängig ausgewählt sind aus
Rhodaminen, Fluoresceinen, Oxazinen, Cyaninen, Bodipy-Farbstoffen
und Alexa-Farbstoffen.
- 10 8. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' aus grünen Fluoreszenz-Markierungsgruppen
ausgewählt sind.
- 15 9. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' gleich sind.
- 20 10. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' verschieden sind.
- 25 11. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 3 bis 10
darstellen.
- 30 12. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass m eine ganze Zahl von 10-90, vorzugsweise von 12-50,
darstellt.
13. Verwendung einer oder mehrerer Sonden nach einem der Ansprüche
1 bis 12 in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer
Probe.

14. Verwendung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Konzentration des nachzuweisenden Analyten $\leq 10^{-9}$ M in
der Probe beträgt.
- 5
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Analyt eine Nukleinsäure ist.
- 10
16. Verwendung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die nachzuweisende Nukleinsäure eine RNA aus einer
biologischen Probe oder eine daraus synthetisierte nicht-amplifizierte
cDNA ist.
- 15
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die nachzuweisende Nukleinsäure eine nicht-amplifizierte
genomische DNA ist.
- 20
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17 in der
Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS).
- 25
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass man mehrere Sonden mit jeweils verschiedener Sequenz und
verschiedenen Markierungsgruppen zum Nachweis eines einzigen
Analyten einsetzt.
- 30
20. Verwendung nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Nachweis eine Kreuzkorrelationsbestimmung umfasst.

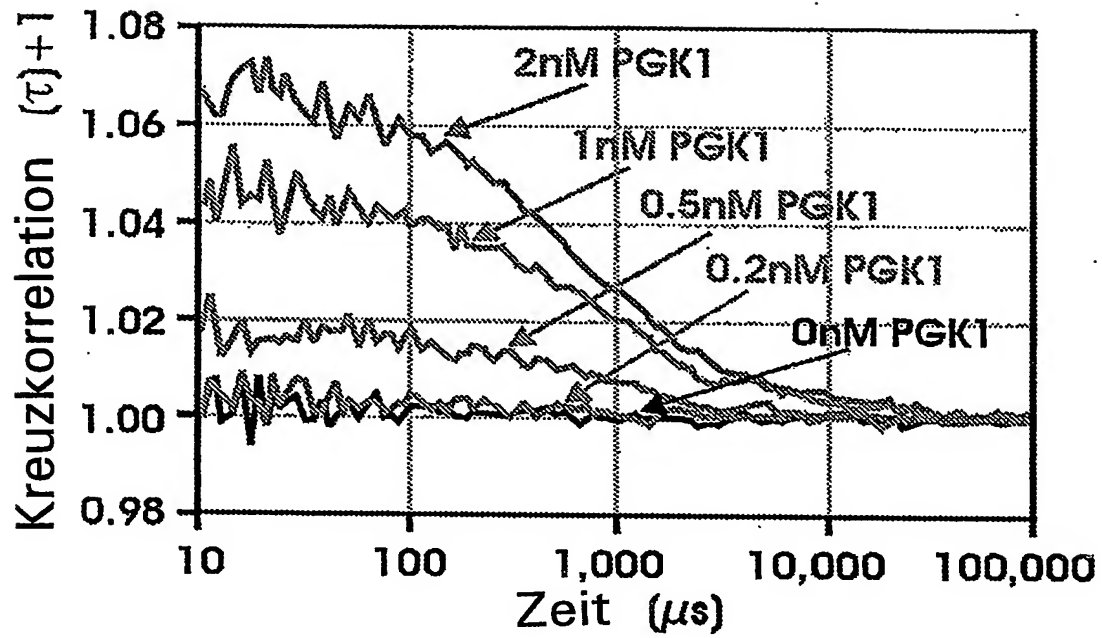
- 5
21. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einer oder mehreren Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 12 unter Bedingungen, bei denen eine Bindung der einen oder mehreren Sonden an den nachzuweisenden Analyten erfolgen kann, und Bestimmen, ob eine Bindung stattfindet oder nicht.
- 10
22. Verwendung nach Anspruch 21, umfassend den Nachweis einer Nukleinsäure durch Hybridisierung.
23. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet,** dass die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Inkontaktbringen nicht amplifiziert wird.

Zusammenfassung

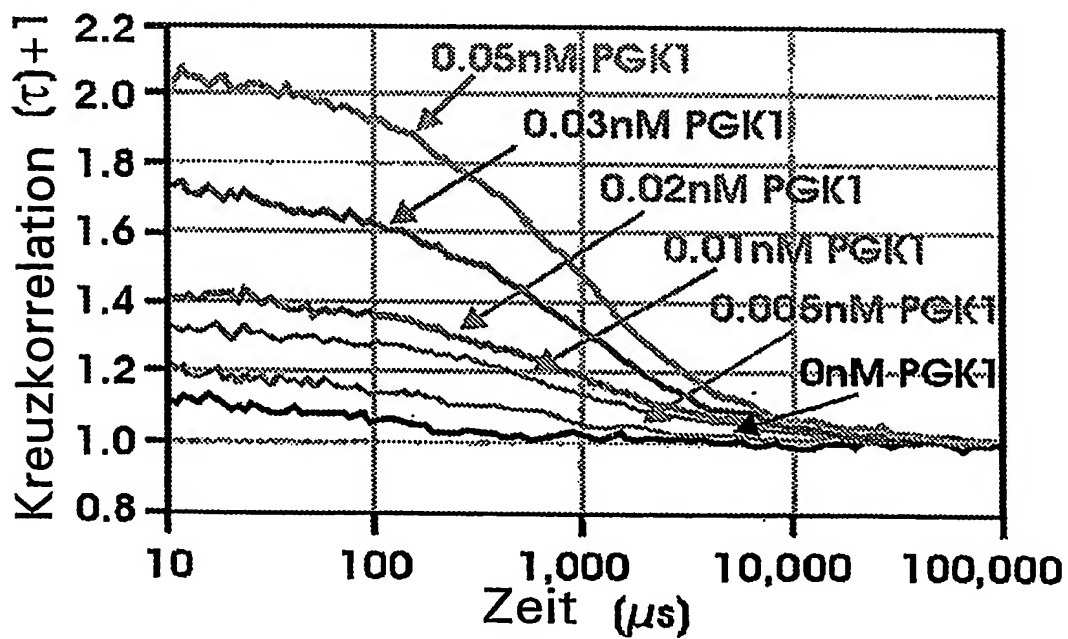
Die vorliegende Erfindung betrifft 5'-3'-Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum
5 Nachweis von Analyten, insbesondere von Nukleinsäuren, insbesondere für
die konfokale Fluoreszenzspektroskopie.

10 pu/ANM/30024P DE-06.06.2003

Figur 1



Figur 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.